

На правах рукописи

МОРОЗОВА
Лидия Григорьевна

ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ
HELICOBACTER PYLORI,
ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ЯЗВЕННЫХ
ГАСТРОДУОДЕНИТАХ И ОНКОЛОГИЧЕСКИХ
ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЖЕЛУДКА.

03.00.07.= микробиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань 2005

Работа выполнена в Казанской государственной медицинской академии МЗ СР РФ

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, профессор **Поздеев Оскар Кимович**

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор

Ильинская Ольга Николаевна

Доктор биологических наук

Чернов Владислав Моисеевич

Ведущая организация:

Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2005 года
в _____ часов на заседании диссертационного совета Д.212.081.08
при Казанском государственном университете имени
В.И. Ульянова-Ленина Министерства образования и науки РФ
(420008, Казань, ул.Кремлевская, дом18 _____)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им.
Н.И.Лобачевского Казанского государственного университета
имени В.И. Ульянова-Ленина Министерства образования и науки
Российской Федерации

Автореферат разослан «_____» _____ 2005 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

А.Н.Аскарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность проблемы. Известно, что основными причинами развития рецидивов язвенных гастритов (более 80% случаев) и дуоденитов (более 95% случаев) являются хронические воспалительные поражения слизистой оболочки, вызванные, в том числе, колонизацией бактериями *Helicobacter pylori* (Григорьев П.Я., Раппопорт С.И., Агафонова Н.А., и соавт., 1999, Avunduc C., Navab F., Hamf L., 1995). Более того, ряд авторов (Adrian L., 1995, Atherton J.C., Cao P., Peek R.M., 1995, Graham D., 1997, Рысс Е.С., Звартау Э.Э., 1998, Крылов Н.Н., Кузин М.И. 2000) даже предлагает расширить рамки общепризнанной формулы «без кислоты нет язвы» до формулы «без кислоты и *H.pylori* нет язвы», подчеркивая, тем самым, ведущее значение микробной инвазии в этиологии язвенной болезни. Во всяком случае, в настоящее время, этиологическая значимость бактерий в развитии рецидивирующих язвенных гастродуоденитов не вызывает сомнений (Буянов В.М., 1991, Зайцева Н.К., 1991, Булгаков Г.А., Кубышкин В.А., 2001; Byrd J., Schepnes H., Juncer C., 1995).

В тоже время, несмотря на определенные успехи гастроэнтерологии, терапевтическое лечение язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки не позволяет достичь стойких ремиссий и избежать присущих язвенной патологии осложнений при которых консервативные меры воздействия не эффективны. В среднем, около 30% больных гастродуоденальными язвами нуждаются в проведении хирургического лечения (Сибулья У.Ф, Труве Р.А, Йысте Э. 1980). При этом значительное число случаев заканчивается рецидивами, индуцированными, в том числе, хеликобактерами.

Помимо возрастающей значимости язвенной патологии, в ХХІ веке свою тенденцию к увеличению частоты заболеваемости сохраняют злокачественные поражения желудка (Аксель Е.М, Давыдов М.И. Ушакова Т.И., 2001). Известно, что раки желудка практически никогда не возникают на фоне неизменной слизистой. Как правило, ему предшествуют процессы, обозначаемые как предраковые (Серов, В.В., Пальцев М.А., 1998). Указанное еще раз подчеркивает значимость их своевременного распознавания в плане профилактики злокачественных заболеваний желудка (Correa P., 1995). Следует отметить, что несмотря на изученность морфологии и морфогенеза очаговых изменений слизистой, этиологические факторы и механизмы их развития остаются до конца неясными. В последнее время возникновение неопластических процессов связывают с колонизацией слизистой *H.pylori*, но механизмы, приводящие к злокачественной трансформации слизистой оболочки желудка остаются не до конца изученными.

Как известно, злокачественной трансформации предшествует хронический атрофический гастрит, в этиологии которого важную роль играет персистенция *H.pylori*, что приводит к прогрессированию патологических изменений в слизистой желудка (Meining A. e.a., 2001). Установлено, что у лиц, инфицированных *H.pylori*, рак желудка встречаются в 4-8 раз чаще, чем у здоровых, что послужило одним из аргументов в признании бактерий как возможных канцерогенов (Eurogast Study Group, 1993; Аруин Л.И., 1994; Forman D., 1996). Установление связи между инфицированностью *H. pylori* и раком желудка дало основание Международному агентству по изучению рака отнести его к канцерогенам I группы (IARC, 1994).

Вышеуказанное свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения роли *H. pylori* в патогенезе язвенных гастродуоденитов и онкологических заболеваний желудка, разработки эффективных методов диагностики, профилактики и лечения.

Цель исследования: Определить значимость инфицирования *H. pylori* в развитии различных форм гастродуоденальных и онкологических заболеваний у лиц разного возраста и пола.

Задачи исследования:

1. Выявить частоту инфицированности *H. pylori* у больных с язвенными гастродуоденитами и онкологическими заболеваниями желудка.
2. Изучить влияние количественного фактора обсемененности слизистой *H. pylori* на формирование различных патологий желудка и двенадцатиперстной кишки.
3. Определить вирулентность и адгезивность изолятов *H. pylori*, выделенных от больных с различными патологиями желудочно-кишечного тракта.
4. Оценить частоту выявляемости *H. pylori* различными методами и сопоставить их эффективность в диагностике хеликобактериоза.
5. Изучить эффективность эрадикационной терапии *H. pylori* у инфицированных лиц.
6. Определить возможность длительной транспортировки и хранения биоптатов, содержащих *H. pylori*.

Научная новизна. Выявлена связь между степенью инфицированности *H. pylori* и развитием патологии слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки. Определен характер обсеменения слизистой до и после проведения эрадикационной терапии. Впервые предложен комплексный алгоритм определения наличия *H. pylori* в слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки, включающий бактериоскопический, биохимический и бактериологический методы с последующим определением вирулентных свойств выделенных изолятов. Впервые предложены модифицированные методы микроаэрофильного культивирования хеликобактеров и определения уреазной активности бактерий в Clo-тесте. Определены адгезивные и вирулентные свойства выделенных штаммов *H. pylori*. Впервые доказана возможность более длительной транспортировки и хранения биоптатов слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки, содержащих *H. pylori*.

Научно-практическая значимость работы. Обнаружение связи патологии желудочно-кишечного тракта со степенью инфицированности *H. pylori* представляется перспективным в плане воздействия на течение язвенного процесса и некоторых этапов канцерогенеза. В частности, элиминация бактерий позволяет избегать хирургических вмешательств по поводу язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, корректировать некоторые виды очаговой патологии легкой степени и в ряде случаев привести к регрессии предраковых изменений.

Полученные данные клинико-экспериментальных исследований показали высокую эффективность комплексной индикации хеликобактеров и возможности внедрения его в работу бактериологических лабораторий. Разработанный модифицированный метод микроаэрофильного культивирования хеликобактеров не требует привлечения

специальных питательных сред и оборудования и может быть легко внедрен в практику. Предложена модификация Clo-теста, позволяющая более быстро и эффективно оценивать уреазную активность *H. pylori*. Установлена возможность применения доступных питательных сред (эритрит-кровяного агара и кровяного агара, дополненных антибиотиками и кровяного агара) для выделения хеликобактеров. Предлагаемые методы определения адгезивных и вирулентных свойств изолятов *H. pylori* вполне доступны для внедрения в работу бактериологических лабораторий. Разработан режим транспортировки и хранения биопсийного материала, направляемого на исследования при подозрении на хеликобактериоз.

Положения, выносимые на защиту

1. Значительная часть язвенной патологии желудка и двенадцатиперстной кишки, а также трансформаций эпителия слизистой желудочно-кишечного тракта, может быть ассоциированной с колонизацией *H. pylori*.

2. Комбинированный метод выявления *H. pylori* является наиболее эффективным по сравнению с другими способами индикации бактерий.

3. Адгезивные свойства *H. pylori*, выявляемые в реакции маннозозависимой гемагглютинации, можно расценивать как маркер вирулентности бактерий.

4. Элиминация *H. pylori* со слизистой способна сократить частоту моторно-эвакуаторных нарушений в раннем послеоперационном периоде, а на ранних этапах онкогенеза способствует снижению риска возникновения злокачественных новообразований желудка.

5. Установлена обратная корреляция между

обсемененностью и сроками доставки в бактериологическую лабораторию биопатов слизистых желудка и двенадцатиперстной кишки, инфицированных *H. pylori*.

Апробация материалов работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на научно-практических конференциях молодых ученых Казанской государственной медицинской академии (Казань 2001, 2002, 2003), на научно-практической конференции «Современные проблемы медицинской науки и практики» (Казань, 2000), на VIII съезде Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 2002), на Международной конференции «Хирургические инфекции: профилактика и лечение» (Москва, 2003), на XI научно-практической конференции Поволжского региона «Окружающая среда и здоровье населения» (Казань, 2003), на совместном заседании кафедр эндоскопической и общей хирургии, микробиологии, эндоскопии Казанской Государственной Медицинской Академии, сотрудников городской больницы № 11 г. Казани, сотрудников городской больницы № 2 г. Набережные Челны.

Внедрение результатов работы. Разработанный комплексный метод диагностики хеликобактериоза внедрен в практическую деятельность больницы № 2 г. Набережные Челны и в повседневную практику Казанского городского центра хирургии язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки при городской больнице № 11 г. Казани, в работу клинического онкологического диспансера МЗ СР Республики Татарстан, в работу бактериологической лаборатории Казанской

государственной медицинской академии МЗ СР РФ, в учебный процесс кафедр микробиологии Казанской государственной медицинской академии МЗ СР РФ и Казанского государственного медицинского университета МЗ СР РФ.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, получено 3 удостоверения на рационализаторские предложения и 2 патента на изобретение.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на ____ страниц ____ машинописного текста, состоит из введения, литературного обзора, шести глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, содержащего отечественных и зарубежных авторов. Работа иллюстрирована таблицами и рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

При выполнении работы были обследованы больные в возрасте от 20 до 80 лет, обратившиеся в городской Центр хирургии язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки при больнице № 11 г. Казани, в эндоскопический центр Республиканского онкологического клинического диспансера МЗ РТ, в гастроэнтерологическое отделение городской больницы № 2 г. Набережные Челны, с целью эндоскопического исследования верхних отделов желудочно-кишечного тракта. Всем пациентам

проводили диагностическую фиброгастродуоденоскопию (ФГДС).

В Городской центр хирургии язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки обратилось 228 человек (164 мужчины и 64 женщины) с диагнозами: язва желудка (58 человек), язва двенадцатиперстной кишки (101), гастрит (46), гастродуоденит (23).

В гастроэнтерологическое отделение городской больницы № 2 г. Набережные Челны обратились 355 человек (246 мужчин и 109 женщин) с диагнозами: язвенная болезнь желудка (49), язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки (2), гастрит (36), гастродуоденит (25), холесцистопанкреатит (220), колит (6), рак желудка (3).

В Республиканский онкологический диспансер МЗ СР РТ обратилось 226 человек (93 мужчины и 133 женщины). У 196 больных были выявлены патологические изменения слизистой оболочки желудка. Для удобства мы их объединили в термин «очаговые изменения слизистой оболочки желудка» и распределили в следующие основные группы: полипы (аденоматозные — 28 пациентов, гиперпластические — 55); эрозии (поверхностные — 8, воспалительно-гиперпластические — 34); очаговые гипертрофии слизистой оболочки желудка (35 больных); рак желудка (36 пациентов). Контрольную группу составили 30 больных с диагностированным поверхностным гастритом, у которых отсутствовала очаговая патология. Лабораторные исследования проведены на базе кафедры микробиологии КГМА МЗ СР РФ и бактериологической лаборатории городской больницы № 2 г. Набережные Челны. Материалом для исследования являлись биоптаты полученные при ФГДС. Также исследовали фрагменты со слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки, полученные в ходе оперативных вмешательств. Для выделения *H. pylori* биоптаты и фрагменты со слизистой доставляли в лабораторию в транспортной

полужидкой тиогликолевой среде для сохранения аэробной и микроаэрофильной микрофлоры. Для обнаружения *H. pylori* использовали разработанный нами комплексный метод, включающий микроскопию мазков-отпечатков, окрашенных по Граму и фуксином Пфайфера, постановку уреазного теста и бактериологическое выделение и идентификацию культур *H. pylori* с определением степени обсемененности биоптата.

Вирулентность выделенных штаммов определяли по способности воспринимать краситель Романовского-Гимзы. При изучении адгезивных свойств проводили постановку реакции прямой гемагглютинации на стекле с эритроцитами человека, лошади и барана в присутствии D-маннозы.

При диагностировании гастродуоденальной патологии (язвенная болезнь желудка, язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки, гастриты и гастродуодениты), сочетающейся с инфицированием *H. pylori* пациентам назначали курс лечения, направленный на элиминацию бактерий на стационарном, предоперационном, операционном и поликлиническом этапах лечения. Больным назначали: де-нол (по 1 таблетке 4 раза в день за 30 минут до еды), метранидазол (по 0,25 мг 4 раза в день), ранитидин или фамотидин (по 40 мг в сутки) и антибиотики — оксациллин, ампициллин или феноксиметилпенициллин (по 2 г в сутки). Пациентам, нуждающимся в хирургическом вмешательстве, данную антибактериальную терапию проводили в течение 14 суток до операции.

При выписке из стационара всем больным, перенесшим пилоросохраняющую операцию по поводу пилородуоденальной язвы, рекомендовали прием в течение 1 месяца ранитидина (по 150 мг 2 раза в день) или фамотидина (по 20 мг 2 раза в день). Через 1,5 месяца после операции больные проходили контрольный осмотр и обследование в условиях гастроцентра.

Эффективность эрадикационной терапии оценивали через 3 и 6 месяцев применением вышеупомянутого комплексного метода на выявление инфицированности *H. pylori*.

При распознавании трансформаций слизистой желудка (полипы, эрозии, очаговые гипертрофии слизистой и раки желудка), сочетающихся с инфицированием *H. pylori*, пациентам назначали: амоксициллин (по 0,5 г 3 раза в день), фуразолидон (по 0,1 г 2 раза в день), де-нол (по 240 мг 2 раза в день) курсом на 7 суток. Эффективность эрадикационного лечения оценивали через 3, 6 и 12 недель после его окончания курса комплексным методом.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программ Microsoft Office 2000 и Statistica 6.0 for Windows с установлением средней ошибки и определением достоверности по критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При обследовании 228 больных городского Центра хирургии язвенной болезни хеликобактеры были обнаружены у 171 больного ($45,0 \pm 2,8\%$). Наибольшую инфицированность *H. pylori* наблюдали у пациентов с язвенной болезнью желудка ($82,8 \pm 4,96\%$), наименьшую — у больных с гастродуоденитами ($56,5 \pm 10,5\%$). При этом процент высеваемости не зависел от диагноза. Какой-либо разницы в обсемененности хеликобактерами при различных формах гастродуоденальных заболеваний не обнаружено. При всех формах болезней обсемененность варьировала от 10^3 КОЕ/ биоптат до 10^5 КОЕ/биоптат.

Обследование 355 больных городской больницы № 2 г. Набережные

Челны выявило хеликобактеры у 210 лиц ($59\% \pm 2,6\%$). При этом наиболее часто *H. pylori* выявляли при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки ($68,2 \pm 3,1\%$) и желудка ($51,0 \pm 7,1\%$; $P = 0,01$). Изучение степени обсемененности биоптатов установлено, что она варьировала от 10^3 КОЕ/биоптат до 10^7 КОЕ/биоптат. При этом высокую обсемененность (10^5 - 10^7 КОЕ/биоптат) регистрировали в 147 пробах из 210, т.е. в $70,0 \pm 3,1\%$ исследований. При язве 12-перстной кишки — в 109 из 146 ($75,7 \pm 3,5\%$), при язве желудка — в 17 из 25 ($68,0 \pm 9,5\%$), при гастритах — в 7 из 14 ($50,0 \pm 15,0\%$), при холецистопанкреатитах — в 5 из 9 ($55,6 \pm 17,5\%$), при колитах — в 1 из 2-х ($50,0 \pm 9,8\%$) и при раке желудка — в 2 из 2 (100%). Таким образом, какой-либо разницы в обсемененности слизистой желудка и 12-перстной кишки *H. pylori*, зависящей от диагноза не наблюдали. Полученные результаты также установили отсутствие прямой связи между формами гастродуоденальных патологий и степенью обсемененности слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта *H.pylori*.

При обследовании 196 больных Республиканского онкологического клинического диспансера МЗ СР РТ с очаговой патологией слизистой оболочки желудка бактерии были обнаружены у 146 лиц ($75,5 \pm 3,1\%$). У больных с поверхностным гастритом (контрольная группа) частота выявления *H. pylori* составила $46,7 \pm 9,1\%$. Наибольшую инфицированность отмечали у пациентов с эрозиями ($90,1 \pm 4,6\%$), наименьшую — у больных с гиперпластическими полипами ($61,8 \pm 6,6\%$). Таким образом, частота обнаружения *H. pylori* в опытной группе очаговых заболеваний слизистой оболочки желудка была достоверно выше, чем в контрольной ($p < 0,05$).

В контрольной группе *H. pylori* обнаружен у 9 больных, причем у всех пациентов этой группы степень обсемененности биоптатов была самой низкой (10^1 - 10^2 КОЕ/биоптат). При раках желудка высокая степень обнаружения *H. pylori* коррелировала с высокой степенью обсемененности

(10^4 - 10^5 КОЕ/биоптат). В тоже время при полипах, эрозиях и очаговых гипертрофиях слизистой на фоне высокой частоты выделения *H. pylori* высокую степень обсеменности биоптатов наблюдали достоверно реже (в $2,6 \pm 2,6$ - $14,6 \pm 4,8\%$ случаев), чем при раке желудка ($53,9 \pm 9,8\%$). Кроме того, у большинства больных отмечали среднюю степень обсеменности слизистой желудка (10^2 - 10^3 КОЕ/биоптат). Уровень обсеменности у пациентов в опытных группах был достоверно выше по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$).

Полученные результаты выявили прямую зависимость между уровнем трансформации эпителия слизистой желудка и степенью обсеменности слизистой *H. pylori*.

Одним из признаков способности бактерий паразитировать во внутренней среде организма-хозяина является высокая скорость размножения в нем, о чем свидетельствует наличие множества юных клеток в популяции. В их цитоплазме накапливается большое количество рибонуклеотидов, обуславливающих высокую базофилию клеток и способность к выраженной абсорбции анилиновых красителей. Этот феномен связывают с большой активностью дыхательных ферментов у вирулентных штаммов (Григорьева Л.В., Корчак Г.И., Малахова Л.И., 1992).

Проведенные исследования по выявлению способности выделенных штаммов бактерий абсорбировать краситель Романовского-Гимзы показали, что проявление данного признака патогенности коррелировала со степенью тяжести патологий желудочно-кишечного тракта. От больных с язвами желудка, двенадцатиперстной кишки преимущественно выделяли штаммы *H. pylori*, отличающиеся интенсивным включением красителя ($73,6 \pm 6,98\%$ и $90,4 \pm 3,7\%$ соответственно), по сравнению со штаммами, выделенными от больных с гастритами и гастродуоденитами ($58,8 \pm 7,6\%$ и $66,6 \pm 4,2\%$).

При злокачественных опухолях желудка преимущественно выделяли штаммы *H. pylori*, отличающиеся интенсивным включением красителя Романовского-Гимзы ($95,2 \pm 4,7\%$), что позволяет предположить их более высокую вирулентность по сравнению со штаммами, выделенным от больных с гиперпластическими и аденоматозными полипами, эрозиями и очаговыми гипертрофиями желудка (соответственно $5,85 \pm 6,7\%$, $68,75 \pm 4,9\%$ и $64,7 \pm 5,8\%$). Таким образом, полученные результаты позволяют предположить наличие прямой связи между тяжестью поражений желудка и уровнем вирулентности выделенных штаммов *H. pylori*.

Кроме того, нами было обнаружено снижение способности бактерий включать краситель вплоть до ее потери при каждом последующем пересеве бактерий. Указанное свидетельствует о зависимости этой пробы от условий и длительности культивирования.

Важным фактором патогенности бактерий является их способность колонизировать различные эпителии. У грамотрицательных бактерий эти свойства определяет наличие фимбрий различных типов. Наиболее часто последние идентифицируют по различиям в способности агглютинировать эритроциты. В частности, авирулентные штаммы патогенных бактерий несут только маннозочувствительные фимбрии. В отличие от них, вирулентные штаммы способны к маннозозависимой гемагглютинации, что положено в основу дифференцирования адгезинов (Каральник Б.Г., Сарбасова Ш.И., Укбаева Т.Д., 1990).

Нами была изучена способность выделенных штаммов *H. pylori* агглютинировать эритроциты различных животных и человека в присутствии D-маннозы. Установлено, что агглютинирующую активность проявляли $73,2 \pm 2,35\%$ штаммов *H. pylori*, выделенных от больных с язвенными гастродуоденитами, гастритами и гастродуоденитами. Аналогичные свойства проявляли $71,7 \pm 2,75\%$ штаммов *H. pylori*,

выделенных от больных с очаговыми патологиями слизистой оболочки желудка. Наиболее активно бактерии адгезировали к эритроцитам барана и к эритроцитам человека, реже — к эритроцитам лошади ($p < 0,01$). Но при постановке маннозозонезависимой гемагглютинации с эритроцитами человека необходимо учитывать тропизм, присущий *H. pylori* к клеткам человека. Поэтому для изучения гемагглютинирующих свойств *H. pylori* предпочтительно применение эритроцитов барана.

Проведенные исследования показали, что в зависимости от характера гастродуоденальной патологии, от $56,16 \pm 3,84\%$ до $86,53 \pm 4,16\%$ изолятов *H. pylori* были способны к маннозозонезависимой гемагглютинации. Штаммы *H. pylori*, выделенные от больных с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки и язвенной болезнью желудка, адгезировали достоверно чаще ($86,53 \pm 4,16\%$ и $71,42 \pm 4,1\%$ соответственно), чем штаммы, выделенные от больных с гастритами и гастродуоденитами ($56,16 \pm 3,84\%$ и $63,51 \pm 2,8\%$ соответственно). В зависимости характера очаговых трансформаций слизистой желудка, от $54,7 \pm 7,8\%$ до $83,01 \pm 5,3\%$ изолятов *H. pylori* были способны к маннозозонезависимой гемагглютинации. Штаммы бактерий выделенные от больных раками желудка, адгезировали достоверно чаще ($83,01 \pm 5,3\%$), чем штаммы выделенные от больных гиперпластическими аденоматозными полипами, эрозиями и очаговыми гипертрофиями слизистой желудка ($69,0 \pm 3,4\%$, $76,6 \pm 6,7\%$ и $54,7 \pm 3,2\%$ соответственно) случаях. Полученные результаты указывают на наличие выраженной связи между способностью хеликобактеров к маннозозонезависимой агглютинации эритроцитов и тяжестью язвенных гастродуоденальных патологий так и очаговых трансформаций слизистой желудка.

Нами также обнаружена выраженная, статистически достоверная корреляция ($p < 0,01$) между результатами пробы с включением анилиновых красителей и маннозозонезависимой гемагглютинацией у

выделенных штаммов хеликобактеров.

Несмотря на наличие достаточно большого количества публикаций о режиме транспортировки и хранения биопсийного материала, в настоящее время унифицированные рекомендации об их сроках и условиях отсутствуют. Указанное связано с тем, что *H. pylori* является крайне «капризным» микроорганизмом. Допустимо непродолжительное, не более одного часа, хранения образцов при 4 °С. В значительной степени успех культивирования бактерий зависит от транспортных сред, дающих возможность продлить срок транспортировки биоптатов из эндоскопического кабинета до микробиологической лаборатории в течение 1-3 суток, а при хранении при 4 °С до 5-7 суток. Однако, в отсутствии соответствующей нормативной документации, соблюдение подобных условий представляется маловероятным. Мы изучили возможность хранения и транспортировки биоптатов в более длительные сроки (до 14 суток с момента взятия материала). Частота обнаружения *H. pylori* в биоптатах, сохраняемых на холоду и доставленных в первые семь суток от момента взятия материала составляла $66,7 \pm 5,1\%$, а полученных на 8-14 сутки — $66,6 \pm 12,6\%$. Таким образом, продолжительность транспортировки и хранения биоптатов не влияли на высеваемость бактерий. Однако изучение степени обсемененности биоптатов, доставленных в разные сроки от момента взятия материала, показало, что в биоптатах, полученных на сроках до 7 суток с момента забора, высокую обсемененность *H. pylori* наблюдали в $32,8 \pm 6,1\%$, а в доставленных через 7-14 суток — только в $10,0 \pm 9,5\%$. Полученные результаты позволили заключить, что длительность хранения образцов более 6 суток при 4 °С негативно сказывается на уровне обсемененности биоптатов (коэффициент корреляции — $R -0,7$).

В настоящее время для индикации факта инфицирования *H. pylori* предложено большое количество различных методов, и с каждым годом

появляются все новые, а существующие часто подвергаются модернизации. Общеизвестным «золотым стандартом» является получение чистой культуры возбудителя и специфичность бактериологического выделения *H. pylori* составляет 100% (Лапина Т.Л., 1999). Только при получении чистой культуры бактерий можно изучить их факторы патогенности, определить устойчивость к антибактериальным препаратам и т.д. Микроскопическая диагностика, выявляющая *H. pylori* в мазках отпечатках, значительно сокращает время получения результатов и гораздо менее трудоемка, по сравнению с гистологическим. Кроме того микроскопическое исследование позволяет выявить в клетках слизистой оболочки наличие пролиферативных процессов, метаплазии, дисплазии и степени их выраженности, злокачественного перерождения (С.С.Никульшин, 1995). В тоже время, по скорости выявления *H. pylori* в слизистой оболочке, микроскопии биоптатов не уступает биохимический метод, определяющий уреазную активность хеликобактеров (Kateralis P. с соавт., 1995; И.А.Комарова и др., 1998). Уреазный тест прост в выполнении, не требует особой квалификации медицинского персонала, относительно дешев, позволяет быстро получить ответ. Результаты уреазного теста, как правило совпадают с микроскопическими данными, что говорит о высокой достоверности первого (В.М.Бондаренко и др., 1995). При этом метод позволяет обнаружить *H. pylori* в 56-86% (П.Я.Григорьев с соавт., 1997). С другой стороны на момент забора биоптатов на слизистой желудка могут присутствовать и другие бактерии, синтезирующие уреазу (например, сальмонеллы и др.). Мы провели сравнительный анализ эффективности указанных методов выявления хеликобактеров. С помощью микроскопии биоптатов бактерии выявляли в 42,2±5,86% случаев, определением уреазной активности в Clo-тесте — в 80,1±4,79% случаев, тогда как культуры *H. pylori* были получены в 96,1±2,29% случаев.

Сравнительно низкую эффективность микроскопического метода можно связать с тем, что в транспортной среде бактерии легко вымываются из биоптата. Поэтому предпочтительной представляется подготовка мазков-отпечатков врачом-эндоскопистом. При их приготовлении биопсированный образец следует наносить на предметное стекло легким движением, не нарушая естественного расположения клеток в слизи. Затем его подсушивают и передают в бактериологическую лабораторию вместе со вторым биоптатом, предназначенным для посева. При постановке Clo-теста нередко наблюдали отсутствие окраски индикатора на уреазу, при наличии возбудителя в посевах. Поэтому мы предлагаем применять Clo-тест в комбинации с реактивом Круппа. В ходе выделения чистых культур хеликобактеров была оценена эффективность различных питательных сред. На эритрит-кровяном агаре с амфотерицином (ЭКАА) эффективность выделения составила 98,8%, на кровяном агаре с амфотерицином (КАА) — 97,7%, на кровяном агаре (КА) — 92,0%. Для наиболее полного выявления *H. pylori* в настоящем исследовании мы использовали все три среды.

Наиболее оптимальные результаты были получены при сочетании всех трех методов. Эффективность комбинированной методики составила 98,5+1,44%.

Таким образом можно рекомендовать комбинацию микроскопического, биохимического и культурального методов в качестве эффективного метода диагностики инфицирования слизистой желудочно-кишечного тракта *H. pylori*.

После проведения антихеликобактерной терапии нами повторно был обследован 171 больной с язвенными гастродуоденитами. У 168 больных бактерии в биоптатах слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки бактерии отсутствовали. У 3 оставшихся пациентов отмечено существенное снижение степени обсемененности слизистой оболочки

двенадцатиперстной кишки. У части больных (1,47%), получавших лечение по разработанной схеме, отпала необходимость в хирургическом вмешательстве. Проведенный курс предоперационной подготовки оказало благоприятное влияние на течение язвенного процесса и возможность получения терапевтического эффекта консервативным лечением.

Вторую группу составили пациенты с очаговыми трансформациями слизистой желудка. При повторном обследовании 111 пациентов, получавших курс антихеликобактерной терапии, установлено отсутствие бактерий в биоптатах у 93 лиц. У оставшихся 8 человек полной эрадикации достичь не удалось, но отмечено достоверное уменьшение уровня обсемененности слизистой. Им было рекомендовано пройти повторный курс лечения с заменой препарата.

Также было установлено, что на фоне проводимого лечения патологические изменения слизистой оболочки желудка (полипы, эрозии, злокачественные опухоли) подверглись заметной регрессии, диагностированные цитологически до начала лечения. Только у больных с большими опухолями потребовалось хирургическое вмешательство. Учитывая высокую частоту обнаружения вирулентных штаммов *H. pylori* при патологических изменениях и тенденцию к их обратимости, преимущественно на начальных этапах злокачественной трансформации, можно сделать вывод о наличии определенной связи между развитием подобных патологий с инфицированностью *H. pylori*.

Согласно Российским рекомендациям по диагностике и лечению хеликобактерной инфекции эффективность противохеликобактерной терапии необходимо оценивать через 3-6 недель после окончания курса химиотерапии (Лапина Т.Л., 1999). Хотя этого срока достаточно для оценки эффективности этиотропного лечения, учитывая определенный дискомфорт частых эндоскопических исследований, мы предлагаем проводить контрольное обследование не ранее 3 месяцев после его

завершения, а выявление хеликобактеров следует проводить с применением комплексного метода. Контрольные обследования больных через 3 месяца после завершения курса эрадикационной терапии показали сохранение стойкой ремиссии, прямо связанной с успешной санацией слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки.

Изменение ранее существующего метода предоперационной подготовки больного на разработанную в Казанском городском центре хирургии язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, включающую в себя курс антихеликобактерной терапии, позволило в 1,47% случаев добиться выздоровления больных без хирургического вмешательства. Разработанная программа ведения больных с язвенными гастродуоденитами на предоперационном, операционном и послеоперационном периодах позволила сократить частоту моторно-эвакуационных нарушений в раннем послеоперационном периоде, по сравнению с общепринятыми способами.

Несмотря на изученность морфогенеза очаговых трансформаций слизистой желудка в виде папиллярных разрастаний, очаговых гипертрофий, полипов, эрозий, этиологические факторы и механизмы их возникновения не до конца ясны (Аруин Л.И., Ильиченко А.А., 1982; Debongnie J.C., 1999; Ивашкин В.Т., Баранская Е.Т., 2001; Kachiwagi H., 2003). Исследования прилегающей к области патологии слизистой оболочки желудка свидетельствуют, что очаговые патологии в виде полипов обоих типов, эрозий и очаговых гипертрофий часто сопровождается хроническое инфицирование хеликобактерами с умеренной степенью обсемененности (10^2 - 10^3 КОЕ/б). Учитывая, что *H. pylori* вызывает повреждение всей системы клеточного обновления в эпителии желудка и развитие нарушений процессов регенерации, приводящее к появлению предраковых изменений, мы предлагаем применение эрадикационной терапии в качестве первоначального этапа комплексного лечения очаговой

патологии для исключения возможности рецидивов этих заболеваний. Обратимость патологических изменений слизистой оболочки при язвенных гастродуоденитах, гастродуоденитах и на начальных этапах онкогенеза, подтвержденная в ходе нашего исследования, после успешной антибактериальной терапии может способствовать заживлению эрозий, язв, предупреждению обострений и осложнений, снижению риска возникновения рака желудка и служить одним из методов первичной профилактики злокачественных новообразований желудка.

ВЫВОДЫ

1. Выявлена высокая частота инфицирования *H. pylori* больных с язвенными гастродуоденитами (56,5-82,8% случаев) и очаговыми трансформациями слизистой желудка (61,8-90,1% случаев).

2. Хроническое инфицирование хеликобактерами может служить одним из факторов, приводящим к развитию злокачественных трансформаций эпителия слизистой желудка. Особое значение может иметь не только факт инфицирования, но и степень обсемененности бактериями.

3. Тяжесть патологических изменений прямо зависит от вирулентности штаммов *H. pylori*. Одним из маркеров патогенности бактерий является адгезивность, выявленная в реакции маннозозависимой агглютинации.

4. Проведение антихеликобактерной терапии приводит к регрессу патологических изменений при очаговых изменениях эпителия слизистой желудка. Этот эффект наиболее четко проявляется на начальных этапах злокачественных трансформаций, а в ряде случаев, и при предраковых состояниях.

5. Разработан и внедрен в практику доступный комплексный метод

обнаружения *H. pylori* в биоптатах слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки.

6. Определен режим более длительного хранения и транспортировки биоптатов слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки образцов, инфицированных *H. pylori*.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.

1. Предложен комбинированный метод обнаружения *H. pylori* в биоптатах слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки, позволяющий быстро и эффективно выявить факт инфицирования и назначить соответствующее лечение.

2. Предложен метод культивирования *H. pylori* в микроаэрофильных условиях, создаваемых смешиванием NaHCO_3 и 10% H_2SO_4 и сжиганием избытка кислорода с помощью стеариновой свечи. Подобный подход позволяет отказаться от дорогостоящих газогенераторных пакетов.

3. Предложен модифицированный метод оценки уреазной активности *H. Pylori*, позволяющий применять Clo-тест в комбинации с реактивом Круппа (для выявления аммиака).

4. Предложен метод определения вирулентных свойств свежевыделенных штаммов *H. pylori* по способности абсорбировать краситель Романовского-Гимзы и агглютинировать эритроциты (предпочтительно применение эритроцитов барана) в присутствии D-маннозы.

5. Предложен алгоритм повторного обследования больных с язвенными гастродуоденитами, гастритами, гастродуоденитами и очаговыми патологиями желудка комплексным методом не ранее 3 месяцев после проведения антибактериальной терапии для установления его эффективности.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Фартдинова М.В. **Инфицированность хеликобактерами слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки при различных патологиях желудочно-кишечного тракта** / Фартдинова М.В., Морозова Л.Г., Лапшина Г.Н. // Современные проблемы медицинской науки и практики: Сборник тезисов / Конференция посвященная 80-летию со дня основания Казанской государственной медицинской академии, Казань 9 июня 2000г.=Казань, 2000. – С.19-20.
2. **Морозова Л.Г. Комплексный метод бактериологической диагностики хеликобактериоза** /Морозова Л.Г.,Лапшина Г.Н. // Современные проблемы медицинской науки и практики: Сборник тезисов / Конференция посвященная 80-летию со дня основания Казанской государственной медицинской академии, Казань 9 июня 2000г.=Казань, 2000. – С.45-46.
3. Поздеев О.К. **Инфицированность хеликобактерами слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки при различных заболеваниях желудочно-кишечного тракта** / Поздеев О.К., Морозова Л.Г., Фартдинова М.В., Лапшина Г.Н., Бакиров Р.Р. // Казанский медицинский журнал. – 2000 – №2, С.98-101
4. Шпалинский Г.В. **Повторная колонизация слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки *H. pylori* у больных, перенесших дуодено-пилоропластику резецированным желудком** /Шпалинский Г.В., Морозова Л.Г. Лапшина Г.Н. // Современные проблемы медицинской науки и практики: Сборник тезисов / Конференция посвященная 80-летию со дня основания Казанской государственной медицинской академии, Казань 9 июня 2000г.=Казань, 2000. – С.14.
5. Шпалинский Г.В. **Этиологическая роль хеликобактеров в послеоперационных рецидивах язвенной болезни желудка и 12 -и перстной кишки** / Шпалинский Г.В., Морозова Л.Г., Лапшина Г.Н. // Современные проблемы медицинской науки и практики: Сборник тезисов / Конференция посвященная 80-летию со дня основания Казанской государственной медицинской академии, Казань 9 июня 2000г.=Казань, 2000. – С.47.
6. **Морозова Л.Г. Особенности транспортировки и хранения биоптатов при хеликобактериозе** / Морозова Л.Г. , Лапшина Г.Н. // Социально-экономическое и медико-профилактические аспекты здравоохранения: Сборник тезисов / Научно-практическая конференция молодых ученых, Казань 20 апреля 2001г. = Казань,2001. = С.26.
7. **Морозова Л.Г. Маркеры вирулентности *H. pylori*, выделенных от**

- больных с различной патологией желудка и двенадцатиперстной кишки** / Морозова Л.Г., Исаева Г.Ш., Поздеев О.К., Лапшина Г.Н. // Эпидемиология XXI века: Сборник статей в 4-х томах / V111 Всероссийский съезд эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, Москва 26-28 марта 2002г. = Москва, 2002. = Т.1. = С.204.
8. Исаева Г. Ш. **H. pylori у больных с различными изменениями эпителия желудка** / Исаева Г.Ш., Муравьева Е.Н, Морозова Л.Г. // Социально-экономические и медико-профилактические аспекты здравоохранения: Сборник тезисов / Научно-практическая конференция молодых ученых, Казань 26 апреля 2002г. = Казань, 2002. = С.25-27.
 9. Исаева Г. Ш. **Устойчивость штаммов H. pylori, выделенных от больных с очаговой патологией желудка, к антибактериальным препаратам** / Исаева Г. Ш., Морозова Л.Г. // Социально-экономические и медико-профилактические аспекты здравоохранения: Сборник тезисов / Научно-практическая конференция молодых ученых, Казань 24 апреля 2003г. = Казань, 2003. = С.46-48.
 10. **Морозова Л.Г. Н. Хеликобактериоз при язвенной болезни желудка и профилактика анастомозитов после пилоросохраняющей пластики** / Морозова Л.Г., Поздеев О. К., Шпалинский Г. В., Лапшина Г. Н. // Окружающая среда и здоровье населения: Сборник тезисов / XI научно-практическая конференция Поволжского региона, Казань 28-29 апреля 2003г. = Казань, 2003. = С.49-50.
 11. Исаева Г.Ш. **Динамика морфологических изменений слизистой оболочки желудка у пациентов, инфицированных H. Pylori, под влиянием эрадикационной терапии** / Исаева Г.Ш., Морозова Л.Г., Поздеев О.К., Лапшина Г.Н., Муффер К. // Окружающая среда и здоровье населения: Сборник тезисов / XI научно-практическая конференция Поволжского региона, Казань 28-29 мая 2004г. = Казань, 2004. = С.22-25.
 12. Якупов Р.Р. **Ксимедон в комплексном лечении больных с язвенными гастродуоденальными кровотечениями** / Якупов Р.Р, Доброквашин С.В., Морозова Л.Г., Поздеев О.К. // Казанский медицинский журнал. – 2005. = №2. = С.98-101.

Патенты на изобретения по теме диссертации.

1. **Морозова Л.Г. Метод выделения культур H. pylori** / Морозова Л.Г, Поздеев О.К., Исаева Г.Ш. ,Лапшина Г.Н. Муффер К. // Патент №2004123018. Российское агенство по патентам и товарным знакам.
2. **Якупов Р. Р. Способ лечения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки** / Якупов Р.Р., Доброквашин С.В., Морозова Л.Г., Поздеев О.К. // Патент №2004121262. Российское агенство по патентам и товарным знакам

Рационализаторские предложения по теме диссертции.

1. **Морозова Л.Г. Комплексный метод бактериологической диагностики хеликобактериоза / Морозова Л.Г., Лапшина Г.Н. // Рационализаторское предложение № 806/60 от 15.09.04. КГМА, Казань.**
2. **Морозова Л.Г. Модифицированный метод микроаэрофильного культивирования *H. pylori* / Морозова Л.Г., Лапшина Г.Н. // Рационализаторское предложение № 807/61 от 15.09.04. КГМА, Казань.**
3. **Морозова Л.Г. Модификация Clo-теста при выделении *H. pylori* / Морозова Л.Г., Лапшина Г.Н. // Рационализаторское предложение № 802/62 от 15.09.04. КГМА, Казань.**